

**Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap**

Institutionen för biomedicin och veterinärfolkhälsovetenskap, sektionen för immunologi

# **Förlust av tolerans vid Inflammatory Bowel Disease på hund?**



*Klara Huitfeldt*

*Uppsala  
2015*

*Kandidatarbete 15 hp inom veterinärprogrammet*

*Kandidatarbete 2015:07*



# Förlust av tolerans vid Inflammatory Bowel Disease på hund?

## Loss of tolerance in canine Inflammatory Bowel Disease?

*Klara Huitfeldt*

**Handledare:** *Caroline Fossum & Magnus Åbrink, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, sektionen för immunologi*

**Examinator:** *Eva Tydén, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

*Kandidatarbete i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** grund nivå, G2E

**Kurskod:** EX0700

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2015

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen / Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Delnummer i serie:** 2015:07

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** *immunologi, Inflammatory Bowel Disease, tarmsjukdom, hund, tolerans*

**Key words:** *immunology, Inflammatory Bowel Disease, intestinal disease, dog, tolerance*

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, sektionen för immunologi



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

<b>Sammanfattning .....</b>	<b>1</b>
<b>Summary .....</b>	<b>2</b>
<b>Inledning.....</b>	<b>3</b>
<b>Material och metoder .....</b>	<b>3</b>
<b>Litteraturöversikt.....</b>	<b>4</b>
Inflammatory Bowel Disease .....	4
Tolerans .....	4
Tarmbarriär .....	5
<i>Bruten barriär .....</i>	<i>5</i>
PRR:s i tarmen.....	6
<i>PRR och tolerans.....</i>	<i>7</i>
<i>PRR och betydelse för IBD.....</i>	<i>7</i>
TLR.....	7
NOD-2 och NF-kB.....	9
Bakteriefloran och dess betydelse.....	10
<i>Bakteriefloran vid IBD .....</i>	<i>10</i>
<b>Diskussion .....</b>	<b>11</b>
<b>Referenslista .....</b>	<b>15</b>



## SAMMANFATTNING

Inflammatory bowel disease (IBD) är ett samlingsnamn för en grupp inflammatoriska tarmsjukdomar och en av de vanligaste orsakerna till kroniska mag-tarmsymtom hos hund. Orsakerna till IBD är inte helt fastställda men tarmslemhinnans immunförsvar, bakterieflora, genetiska faktorer och miljöfaktorer anses vara centrala för tillståndet. En av de mest utbredda uppfattningarna är att sjukdomen uppkommer som ett resultat av bristande immunologisk tolerans som gör att immunförsvaret felaktigt går till attack mot harmlösa antigen.

Syftet med den här litteraturstudien var att undersöka vilken roll Pattern recognition receptors (PRRs) har i IBD, hur tarmbarriären påverkar risken för sjukdomen, vilka förändringar av tarmfloran som setts hos IBD-hundar och hur floran påverkar sjukdomsuppkomst.

Litteraturen menar att en defekt tarmbarriär är en av de nyckelfaktorer som hör ihop med IBD. Ökad permeabilitet i tarmen kan öka exponeringen, och därmed interaktion, mellan antigen och immunförsvar vilket inducerar inflammation. Oavsett om en defekt tarmbarriär uppkommer som en effekt av sjukdomen eller om det är en direkt orsak till IBD så är det troligen viktigt för att det ska bli kroniskt. Flera studier har även kopplat IBD till ändrat uttryck av PRRs. Ett ökat uttryck av receptorerna anses kunna öka interaktionen mellan tarmflora och immunförsvar vilket kan trigga immunförsvaret. Också singel nucleotid polymorfism's i gener som kodar för PRRs har satts i samband med IBD. Dessa mutationer har visats leda till ändrad struktur hos receptorerna vilket i sin tur tros kunna påverka deras funktion och tarmens känslighet för antigen. Studier som berör tarmfloran hos IBD-hundar har kommit fram till divergerade resultat. Alla studier visar dock på någon typ av förändring av floran och en ökning av *Proteobacteria* verkar vara genomgående. Den kommensala tarmfloran är viktig för att tarmens immunsystem ska utvecklas normalt, påverkar immunreglering, kan ge näring till enterocyter och förhindra kolonisation av patogena organismer. Samtidigt delar den kommensala floran flera strukturer med patogena organismer. Dessa strukturer kan inducera immunreaktioner och eftersom ingen specifik patogen isolerats hos IBD-hundar har det antagits att det är strukturer från kommensaler som fungerar som den "inflammatoriska triggern" vid IBD.

Störd tarmbarriär, defekt immunsystem (exempelvis felaktiga PRR) och ändrad tarmflora är alla faktorer som kan påverka tarmens immunologiska tolerans. Min slutsats efter denna litteraturstudie är att dessa komponenter förekommer i olika omfattning och har olika betydelse för olika IBD-fall. Eftersom IBD är ett samlingsnamn för en grupp sjukdomar anser jag det troligt att det inte finns en patogenes eller en etiologi som stämmer in på alla sjuka hundar. Jag tror det kan skilja sig IBD-hundar emellan men att de alla har defekter som sammanlagt leder till en oönskad tarminflammation.

## SUMMARY

Inflammatory bowel disease (IBD) encompasses a group of inflammatory intestinal diseases and is one of the most common causes of chronic gastrointestinal symptoms in dogs. The exact cause of IBD is not known but it is believed that the gut immune system, intestine microbiota, an underlying genetic susceptibility of the host and environmental factors is important. One of the most established theories is that the disease develops as a result of lost immunological tolerance leading to an abnormal immune response to harmless antigens.

The aim of this literature study was to investigate the roll of Pattern recognition receptors (PRRs) in IBD, how the intestinal barrier influence the risk of the disease, what changes of the intestine microbiota that can be found in sick dogs and how these changes might influence the genesis of the disease.

According to the literature, an impaired intestinal barrier is one of the key factors for IBD. An increased permeability in the gut may increase the exposure to antigens and interaction between antigens and immune system which induces inflammation. Irrespective of whatever the impaired intestinal barrier is a result of the disease or if it is the direct cause of IBD, it probably plays an important role in making the condition chronic. Several studies also have associated IBD with a changed expression of PRR's. An increased expression of the receptors is believed to increase the interaction between the gut microbiota and the immune system which can trigger the immune defense. Additionally singel nucleotid polymorfism's in the PRR genes have been associated with IBD. These mutations have been shown to give the receptors a different structure which in turn may influence their function and the intestinal susceptibility to antigens. Results from studies about the gut microbiota in dogs with IBD are diverged. However, all studies show some kind of change of the flora and an increase in *Proteobacteria* seems to be a constant feature. The commensal microbiota is important for the normal development of the gut immune system and can also influence the immune regulation, provide nutritional support for enterocytes and prevent colonization of pathogens. At the same time, the commensal and pathogens share many structures. These structures can induce immunoreactions and because no specific pathogen has been isolated in the IBD-dogs, it has been considered that structures from the commensals trigger the immune system in IBD.

Impaired intestinal barrier, disturbed immune system (e.g. incorrect receptors) and changed gut microbiota may all influence the intestinal immunological tolerance. My conclusion from this study is that these components occurs in different proportions and have varied importance in different IBD-cases. Because IBD is a collective term for a group of diseases I assume that it is not very likely one pathogens or one etiology that applies to all the deceased dogs. I think it differ between individuals but that they all have defects which together lead to an undesired intestinal inflammation.



## INLEDNING

Inflammatory bowel disease (IBD) är ett samlingsnamn för en grupp inflammatoriska tarmsjukdomar (Cerquetella, 2010). Det är en av de vanligaste orsakerna till kroniska mag-tarmsymtom hos hund (Suchodolski *et al.*, 2012a) men även andra djurslag, däribland människa, kan drabbas (Cerquetella, 2010). Den exakta patogenesen och de bakomliggande orsakerna till IBD är inte helt fastställda (Honneffer, 2014). En av de mest studerade mekanismerna är förlorad tolerans (Cerquetella, 2010) där immunförsvaret inte längre kan skilja på patogena- och harmlösa antigen. Försvaret går felaktigt till attack mot foderkomponenter eller den kommensala tarmfloran så att en kronisk tarminflammation uppstår (Catchpole & Allenspach, 2012). Eftersom den exakta patofysiologin bakom IBD hos hund ännu är okänd är sjukdomen svårbehandlad och många gånger används samma behandlingsstrategier som de som utvecklats inom humanmedicin där sjukdomen är mer utredd. Denna överföring mellan human- och veterinärmedicin görs trots att artskillnader i sjukdomsuppkomst är visad (Cerquetella, 2010) och för utveckling av bättre behandlingsmetoder på hund skulle mer forskning vara önskvärd (Allenspach & Werling, 2008).

Denna litteraturstudie har till syfte att besvara tre huvudsakliga frågeställningar med extra fokus på den första.

1. Vilken roll har Pattern recognition receptors för uppkomsten av IBD?
2. Hur påverkar tarmbarriären risken för IBD?
3. Vilka förändringar av tarmflora har setts hos IBD-hundar och hur påverkar de sjukdomsuppkomsten?

## MATERIAL OCH METODER

Litteraturen som berör IBD är omfattande och flera olika djurslag drabbas. Detta har gjort att litteraturstudien har vissa begränsningar. Arbetet fokuserar på IBD hos djurslaget hund och tar upp de teorier kring sjukdomsuppkomst och utveckling som finns bäst beskrivna.

För att hitta artiklar inom ämnet har sökningar gjorts inom databaserna Google Scholar, Web of Science och PubMed. De första sökningarna gjordes med sökfrasen ("inflammatory bowel disease" OR IBD) AND (canine OR dog OR hound). Sökningen gav flera träffar på både vetenskapliga artiklar och review-artiklar som många visade sig vara relevanta. Efter inläsning på området kunde sökningen specificeras och "innate immunity" och "pattern recognition receptors" kompletterade sökfrasen. Några artiklar har även hittats utifrån intressanta artiklars referenser.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Inflammatory Bowel Disease

Inflammatory bowel disease (IBD) är ett samlingsnamn för en grupp tarmsjukdomar. Tillståndet definieras som en inflammation i tarmkanalen med persisterande eller återkommande mag-tarmsymtom orsakat av okänd anledning (Honneffer, 2014). Sjukdomen ses inte bara hos hund utan också hos flera andra djurslag inklusive människa. Olika delar av tarmkanalen kan drabbas av IBD och beroende på vilken/vilka delar av tarmen som inflammeras och vilken immuncellstyp som är den dominerande klassificeras sjukdomen in i olika huvudtyper (Cerquetella, 2010). Den vanligaste typen på hund är lymphoplasmacytisk enterit (LPE) och några andra typer är eosinofil enterit, eosinofil kolit och histocytisk ulcerativ kolit (HUC) (Wdowiak *et al.*, 2013).

Individer som drabbas av IBD får ospecifika symtom. Det vanligaste är kräkning och/eller diarré tillsammans med vikt förlust samt ibland sekundära förändringar som orsakats av mag-tarmsymtomen. Det kan vara exempelvis ascites, beroende på proteinförlust, eller bleka slemhinnor i de fall kroniska blödningar i mag-tarmkanalen uppstått. Diagnosen IBD är vanligast på medelålders hundar (Cerquetella, 2010) och ställs först då histologiska tecken på inflammation observerats och alla andra möjliga orsaker till mag-tarminflammation utesluts. För diagnosen IBD får heller ingen klinisk förbättring ske vid foderbyte eller antibiotikabehandling (Suchodolski *et al.*, 2012b). Hanar och tikar drabbas lika ofta av sjukdomen och vissa raser verkar vara predisponerade för IBD (Cerquetella, 2010). Studier har exempelvis visat att schäfrar har ökad känslighet (Kathrani *et al.*, 2010) och att IBD typen HUC nästan uteslutande drabbar Boxrar (Simpson *et al.*, 2006).

Den exakta etiologin bakom IBD är okänd men det anses vara en multifaktoriell sjukdom där tarmslemhinnans immunförsvar, tarmflora, genetiska- och miljöfaktorer spelar roll (Kathrani *et al.*, 2010). Sjukdomen uppkommer troligen genom en oönskad inflammatorisk reaktion mot den normala tarmfloran hos en genetiskt predisponerad individ (Suchodolski *et al.*, 2010) där en viktig mekanism för patogenesen tros vara bruten immunologisk tolerans (Kathrani *et al.*, 2012).

### Tolerans

Tarmkanalens immunsystem exponeras dagligen för flera olika antigen. Antigenen kan vara strukturer från den egna tarmfloran eller foderkomponenter men också delar från patogena organismer. För att inte bli sjuk är det viktigt att immunsystemet känner igen och reagerar mot patogener samtidigt som det inte får reagera på ofarliga antigen – mot dessa måste det finnas tolerans (German *et al.*, 2003).

Tolerans i tarmen kan uppstå genom olika mekanismer. Det kan ske genom anergi och/eller deletion (apoptos) av antigenspecifika T-celler eller genom att antigenspecifika ”supressor celler”, s.k. T-regulatoriska celler, utsöndrar nedreglerande cytokiner som exempelvis interleukin (IL)-10 och Transforming Growth Factor Beta. Dessutom finns IgA antikroppar

vilka är viktiga för tarmens immunitet. Antikropparna bildas av plasmaceller och begränsar antal antigen som passerar över tarmepitelet genom s.k. immunexklusion. Den minskade passagen av antigen skyddar mot bakterieinvasion och medför att immunförsvaret stimuleras mindre vilket ger ett minskat immunsvär. En annan mekanism som visat sig vara viktig för att tarmens immunsystem ska kunna skilja på patogener och harmlösa antigen är positionering och nedreglering av PRR vilket minskar tarmens interaktion med tarmlumens innehåll.

Bryts toleransen kan en kronisk okontrollerad inflammation uppstå (German *et al.*, 2003) och det är just detta som tros vara den huvudsakliga mekanismen i IBDs patogenes (Kathrani *et al.*, 2012). Förlust av immunologisk tolerans mot ofarliga antigen kan orsakas av en bruten tarmbarriär, felreglerat immunsystem eller en störd tarmflora (Burgener *et al.*, 2008).

### **Tarmbarriär**

Tarmepitelet, bestående av intestinala epitelceller (IEC), fungerar som en barriär mot organismer i tarmlumen. Epitelet hålls ihop av tight junctions och förhindrar att patogener och andra antigen kommer i kontakt med tarmkanalens underliggande vävnad. Genom att vara en fysisk barriär och genom andra immunlogiska mekanismer bidrar IEC till tarmens immunförsvär. Cellerna kan bearbeta och presentera antigen, utsöndra cytokiner och kemokiner och rekrytera inflammatoriska celler då det stimuleras av antigen (Burgener *et al.*, 2008; Hisamatsu *et al.*, 2013). I epitelcellslagret finns några specialiserade IEC med olika funktion. Exempelvis finns Paneth cells som bildar anti-mikrobiella peptider (defensiner), M-celler som transporterar antigen till de underliggande Peyerska placken där lymfocyter finns och bärgerceller som bildar mucus vilket linjerar den apikala sidan av tarmepitelet och förhindrar att bakterier adhererar och invaderar tarmen. Under epitelet finns gut-associated lymphoid tissue (GALT), vilket är den största och mest komplexa vävnaden i kroppen. Vävnaden innefattar alla tarmassocierade lymfknotor, Peyerska plack och lymfocyter och är involverad i induktion av immunsvär mot patogener men bidrar även till immunlogisk tolerans mot harmlösa antigen.

### **Bruten barriär**

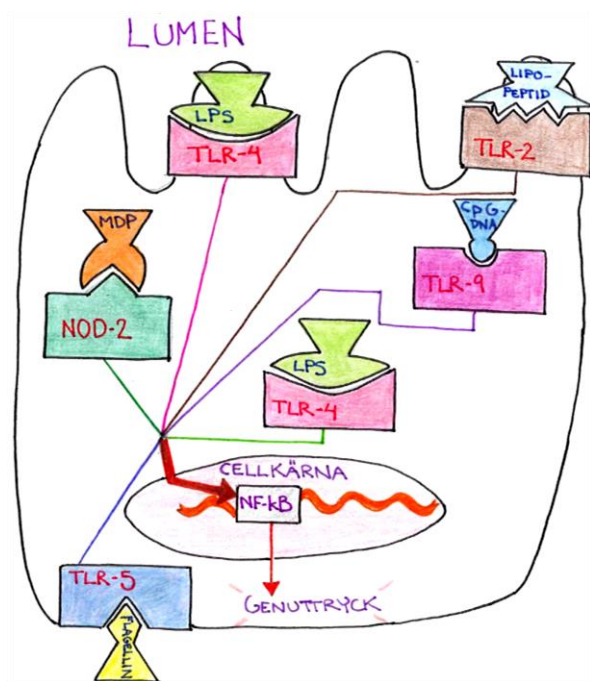
Tarmbarriären kan störas av flera faktorer som exempelvis ändrad tarmflora, ändrad mucusproduktion och epitelskada (Lopetuso *et al.*, 2013). En förstörd eller felreglerad tarmpermeabilitet kan göra att mer antigen tar sig över epitelet vilket i sin tur ökar antigenexponering för immunförsvaret (Kobayashi *et al.*, 2007). Genomsläppligheten ger en ökad risk för att en inflammatorisk reaktion ska triggas (Cario, 2012) och är troligen en viktig faktor för IBD.

Hos människor med den humana IBD-typen Chron's sjukdom har en ökad permeabilitet i tarmen visats och kopplingar har gjorts mellan tarmens genomsläpplighet och sjukdomens aktivitet och mellan genomsläpplighet och risken för återfall. I en studie på hund visade sig tarmslemhinnans permeabilitet var högre hos hundar med LPE jämfört med friska kontroller men huruvida detta kommit före sjukdom eller som ett resultat av den är inte klart (Kobayashi *et al.*, 2007). Oavsett primär orsak kan en förstörd tarmbarriär dock ge en ökad eller

ytterligare exponering av antigen och därigenom också leda till en kronisk inflammation (Cerquetella, 2010).

## PRR:s i tarmen

Pattern recognition receptors (PRR) är en viktig del av det medfödda immunsystemet mot invaderande patogener. De finns hos celler som tillhör det medfödda immunsystemet, som exempelvis makrofager och dendritiska celler, men också hos tarmepitelceller (Burgener *et al.*, 2008) där de reagerar på antigen som brutit igenom tarmens försvarsbarriär av mucus, antimikrobiella peptider och IgA (Magalhaes *et al.*, 2007). Receptorerna aktiveras genom igenkänning av specifika molekyler, så kallade microb-associated molecular patterns (MAMP) vilka är konserverade molekyler på bakterier och andra infektiösa agens (Allenspach & Werling, 2008). Stimulering av receptorerna leder till att en immunologisk försvarsreaktion startar med mål att eliminera eventuell fara (Burgener *et al.*, 2008). Via aktivering av transkriptionsfaktorn NF- $\kappa$ B induceras bildning av olika pro-inflammatoriska cytokiner och kemokiner som frisätts från de celler som bär på receptorerna (Allenspach & Werling, 2008; Okanishi *et al.*, 2013). NF- $\kappa$ B inducerar även transkription av andra gener vilket leder till ett ökat proteinuttryck av t.ex. Toll-like receptors (TLR), Nucleotid binding oligomerisation domain (NOD)-like receptors (NLRs) och celladhesionsmolekyler (CAMs). CAMs har en viktig funktion för leukocyt "homing" och migration till skadad vävnad (Okanishi *et al.*, 2013).



Figur 1. Figuren visar några PRR som är involverade i igenkänning av bakterier i tarmen. Receptorernas respektive position i en tarmcell, exempel på ligander samt en grov förenkling av hur receptorerna signalerar aktivering av NF- $\kappa$ B är inritat. LPS = Lipopolysackarider, MDP = Muramyl dipepti.

### **PRR och tolerans**

Trots att patogena bakterier och den kommensala tarmfloran delar MAMPs är en frisk tarm tolerant mot den vanliga floran. Möjligheten att skilja på patogena bakterier från vanlig tarmflora är bland annat knuten till PRR (Allenspach & Werling, 2008).

Nedreglering av TLR apikalt på tarmepitelet är en av de viktiga mekanismerna som bidrar till tolerans i tarmen. Vid kontinuerlig stimulering av MAMPs från den normala bakteriefloran förflyttas TLR-4 och TLR-2 in i cellen så att igenkännandet av mikroorganismer minskar. Trots sin förflyttning är TLR-4 fortfarande funktionell och kan känna igen lipopolysackarider om patogener penetrerar eller skadar tarmbarriären (Allenspach & Werling, 2008). En annan PRR på tarmepitelcellerna är TLR-5. Receptorn sitter enbart basolateralt där ingen tarmflora normalt ska förekomma. Om receptorn stimuleras av sin ligand flagellin innebär det att en bakterie måste ha brutit genom epitelbarriären och per definition blir det då en patogen (Abreu *et al.*, 2005). Platsförflyttning och lokalisation av TLR ger immunförsvaret möjlighet att känna igen patogener som tagit sig genom epitelbarriären samtidigt som det kan vara tolerant mot den kommensala bakteriefloran som finns apikalt om epitelet, mot tarmlumen (Allenspach & Werling, 2008).

Utöver placering av TLR-receptorer finns det olika faktorer som kan försvaga TLR receptorernas effekt och som därmed är viktiga för tolerans. Två sådana faktorer är Toll-interacting protein (TOLLIP) och peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma). TOLLIP uppregleras i tarmepitelet efter en lång exponering av TLR ligander och finns i stor mängd i en frisk tarm. Proteinet inhiberar en av de faktorer som är viktiga för NF-kBs aktivering och kan därmed minska gen transkription av pro-inflammatoriska mediatorer. PARR-gamma inhiberar istället NF-kBs aktivering direkt och i djurmodeller har det visats att detta protein är uttryckt i minskad mängd vid kolit (Allenspach & Werling, 2008).

### **PRR och betydelse för IBD**

På senare tid har flera studier, både på människor och på djur, sammankopplat förändringar av PRR med IBD (Kathrani *et al.*, 2012). På människa har det visats att ett felreglerat uttryck och polymorfier i PRR-generna utgör en central del i sjukdomens etiologi (Burgener *et al.*, 2008). Polymorfierna har visats kunna ändra receptorernas funktion och därmed leda till en okontrollerad kronisk inflammation (Allenspach & Werling, 2008). Polymorfism i NOD-2 genen anses vara den viktigaste genetiska faktorn för Chron's sjukdom och det har visat att ca 20-40% av alla med sjukdomen bär på varianter av genen (Kathrani *et al.*, 2010).

### **TLR**

På senare år har det gjorts kopplingar mellan PRR och IBD även på hund. Burgener *et al.* (2008) tittade på hur mRNA-uttrycket för TLR i duodenum och kolon skilde sig mellan IBD-hundar och friska kontroller. I studien observerades en betydande ökning av mRNA-uttryck för TLR-2, TLR-4 och TLR-9 hos de sjuka hundarna. Det uppreglerade uttrycket har antagits kunna leda till en ökad inflammation i tarmen genom ökad interaktion mellan receptorer och den normala bakteriefloran. I samma studie undersöktes också hur uttrycket av TLR skilde sig

före och efter behandling med steroider. Inget ändrat uttryck sågs, trots att de flesta hundarna blev kliniskt bättre, vilket antyder att det finns en genetisk predisponering för IBD. Det oförändrade uttrycket efter behandling indikerar även att uppregleringen föregår sjukdomen snarare än att vara en konsekvens av inflammationen (Burgener *et al.*, 2008).

En annan undersökning på IBD har gjorts av Royal Veterinary College (RVC) i USA. Under en tioårsperiod tittade RVC på antalet hundar som diagnostiserades med IBD och kunde visa att 10% av dessa var schäfrar. Den ökade känsligheten hos rasen tyder, i enlighet med Burgener *et al.*s studie på att det finns en genetisk känslighet för IBD (Kathrani *et al.*, 2010).

För att undersöka sambandet mellan IBD och schäfer gjorde Kathrani *et al.* (2010) en studie på singel nucleotid polymorfism's (SNPs) i TLR-genen. De kopplade två stycken SNPs i TLR-4 genen och tre stycken SNPs i TLR-5 genen till sjukdomen hos rasen. De båda SNPs i TLR-4 genen var kopplade till varandra, det vill säga de nedärvs tillsammans, och visades öka risken för sjukdom. Av de SNPs som sågs på TLR-5 genen var två av varianterna skyddande för uppkomst av IBD och den tredje SNP signifikant associerad med ökad risk för sjukdom. Den risk-associerade haplotypen av TLR-5 var på egen hand signifikant kopplad till sjukdom medan det, för att de båda SNP i TLR-4 skulle vara statistiskt betydande krävdes närvaro av den risk-associerade haplotypen av TLR-5.

De SNPs som identifierades i såväl TLR-5 genen som i TLR-4 genen har visats resultera i att en annan aminosyra uttrycks på den färdiga receptorn. Detta kan vara av betydelse eftersom ändrad aminosyra kan leda till en annan struktur hos receptorn och därmed ändra dess funktion. Undersökningar som tittat på var de ändrade aminosyrorna är placerade på receptorerna har visat att de skyddande varianterna av TLR-5 samt de riskassocierade varianterna av TLR-4 ger en annan aminosyra på respektive receptors ligandbindande del medan den riskassocierade SNP:n som identifierats på TLR-5 genen istället påverkar en peptid viktig för receptorns produktion (Kathrani *et al.*, 2010).

Efter upptäckten av kopplingen mellan SNPs i TLR-generna och IBD på schäfer ville Kathrani *et al.* (2011) gå vidare för att se om liknande polymorfier även kunde identifieras och associeras med IBD hos andra raser. En studie som inkluderade 38 raser gjordes och det visades att de två skyddande SNPs i TLR-5-genen som tidigare hittats på schäfer även var signifikant associerat med IBD hos dessa. Vad gäller de risk-associerade typerna av TLR-gener som setts på schäfer kunde ingen koppling göras.

I en annan studie tittade Kathrani *et al.* (2012) direkt på vilken funktionell betydelse som olika SNPs i TLR-5 genen har. De tittade bland annat på hur olika haplotyper av genen påverkade NF-kB aktiviteten och produktion av kemokinen CXCL (IL-8). Studien visade att den risk-associerade haplotypen av TLR-5 är hyper-reaktiv mot sin ligand flagellin jämfört med de skyddande haplotyperna av TLR-5. Utifrån studien har det antagits att den ökade känsligheten hos TLR-5 kan ha en del i den oönskade immunreaktion som ses vid IBD på hund.

Närvaron av den risk-associerade TLR-5 genen kan dock inte helt förklara de kliniska tecknen som ses vid IBD och nyliga studier visar att aktivering av NF-kB, via TLR i tarmens epitelceller, skiljer sig från aktivering av NF-kB i immunceller. Aktivering i epitelcellerna verkar vara skyddande medan aktivering via immunceller har satts i samband med inflammation i kolon. Det har visats att aktivering av TLR-5 under normala förhållanden kan öka uttrycket av bakteriocida och barriärförstärkande mediatorer i tarmen, att de ger en minskad cellapoptos, gör att tarminfektioner inte blir så allvarliga och att det gynnar läkning av tarmepitel. Det är därför troligen inte förens epitelet skadas under inflammation, som exempelvis vid IBD, som flagellinbindning till en TLR-receptor kan ge den överdrivna inflammatoriska reaktion som setts hos hundar med den risk-associerade TLR-5 (Kathrani *et al.*, 2012).

### *NOD-2 och NF-kB*

NOD-2 uttryck, tillsammans med NF-kB aktivitet, har nyligen visat sig vara ökad i inflammerad kolonslemhinna hos människor med Chron's sjukdom. För att se om detta också gäller hund mätte Okanish *et al.* (2013) NOD-2 mRNA och NF-kB aktivering i kolon hos hundar med IBD typen lymphoplasmacytisk kolit (LPC). När resultatet jämfördes med friska kontroller visade sig uttrycket av NOD-2 mRNA vara 63% högre hos de sjuka hundarna jämfört med kontrollerna och transkriptionsfaktorn NF-kBs aktivitet visades vara 45% högre i den inflammerade kolonslemhinnan. Resultaten tyder på att NOD-2 och NF-kB spelar en viktig roll för patogenesen av LPC. Enligt Okanish *et al.* är det låga NOD-2 uttryck som visades hos kontrollerna ett tecken på att celler i tarmen i normalläget har låg reaktivitet mot tarmfloran vilket kan vara en fördel för att upprätthålla tarmhomeostasen. De har föreslagit att en överproduktion av NOD-2 receptorer hos LPC-hundar ökar igenkänningen av peptidoglykaner vilket i sin tur inducerar inflammation. När tarmen förlorar sin tolerans mot antigen från tarmlumens bakterier uppstår sjukdom vilket gör att ytterligare bakterier kan invadera tarmen och att NOD-2 uttrycket ökar (Okanishi *et al.*, 2013).

I studien sågs ökning av både NF-kB och NOD-2 och en koppling mellan dessa har gjorts på humansidan. Observationer på patienter med Chron's sjukdom talar för att NF-kB kan reglera uttrycket av NOD-2 genom att binda till receptorgenens DNA promotor. På detta vis är det möjligt att stimuli genom olika mekanismer, inklusive NOD-2, kan aktivera NF-kB som i sin tur inducerar ökat uttryck av NOD-2 som i sin tur ger ytterligare NF-kB aktivitet och så vidare. Det stabiliseras en slags positiv feed-back loop som ger kontinuerlig frisättning av pro-inflammatoriska cytokiner och kemokiner från epitelet (Okanishi *et al.*, 2013).

I en studie på hundar med IBD-typen LPE, vilken till skillnad från LPC drabbar tunntarmen, har liknande koppling gjorts mellan ökad NF-kB aktivitet och sjukdom. Däremot kunde inget ökat uttryck av NOD-2 mRNA ses i studien vilket antyder att NF-kBs signaleringskaskad skiljer sig i kolon (vid LPC) jämfört med i duodenum (vid LPE). I samma studie undersöktes det hur mRNA-uttrycket för tre olika CAMs skiljde sig mellan LPE hundar och kontroller. En ökning av två CAMs (ICAM-1 och MAdCAM-1) sågs vilket gjort att det antagits att molekylerna har en koppling till LPE. Okanishi *et al.* som gjorde studien föreslår att

proinflammatoriska retningar inducerar ökning av CAMs och aktiverar NF-kB genom olika mekanismer, exempelvis genom TLR, pro-inflammatoriska cytokiner och kemokiner. När NF-kB aktiviteten ökar induceras ytterligare uttryck av CAMs som då kan rekrytera inflammatoriska celler till platsen och aktivera NF-kB ytterligare. Det blir en ond cirkel som troligen bidrar till att en kronisk tarminflammation utvecklas (Okanishi *et al.*, 2013).

## **Bakteriefloran och dess betydelse**

I däggdjurs mag-tarmkanaler finns en riklig och komplex sammansättning av bakterier och andra mikroorganismer – en tarmflora. I studier som undersökt duodenums tarmflora hos hund har det identifierats bakterier inom nio olika fylum, där de mest utbredda varit *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* och *Actinobacteria* (Suchodolski *et al.*, 2012a).

Bakterierna i tarmen har stor påverkan på hundars hälsa och sjukdom. De fungerar som en försvarsbarriär genom att förhindra patogeners kolonisation av tarmen, hjälper sin värd att digenera svårnedbrytbara foderkomponenter, stimulerar immunsystemet och kan bilda metaboliter som ger näring till tarmens enterocyter (Suchodolski *et al.*, 2012b). Floran krävs för att tarmens lymfoida vävnad, GALT ska utvecklas normalt. I frånvaro av bakterierna migrerar inte B- och T-celler till organets lamina propria och det sker ingen utsöndring av IgA-antikroppar (Abreu *et al.*, 2005). Ytterligare påverkan från tarmfloran har identifierats i musmodeller där det visats att vissa *Lactobaciller* kan nedreglera uttryck av pro-inflammatoriska cytokiner genom att minska uttrycket av transkriptionsfaktorn NF-kB (Allenspach & Werling, 2008).

## **Bakteriefloran vid IBD**

Studier som gjorts på IBD-sjuka hundar har påvisat liknande, men inte samma, förändringar av tarmfloran och mycket pekar mot att bakteriefloran har en viktig betydelse för IBDs patogenes (Honneffer, 2014). Troligen är det interaktioner mellan den kommensala bakteriefloran och immunförsvaret som, i genetiskt känsliga individer ger upphov till sjukdom (Suchodolski *et al.*, 2010).

Det är inte känt om den ändrade tarmflora som påvisas hos hundar med IBD kommer före sjukdomen eller om det är en konsekvens av den. I studier på människor med IBD har det dock kunnat visas att tarmfloran i stort sett är likadan i oinflammade som i inflammerade tarmavsnitt hos samma individ vilket tyder på en primär funktion hos bakterierna (Suchodolski *et al.*, 2010). Bakteriefloras betydelse för IBD styrks av att det på djurmodeller som spontant utvecklar IBD kunnat visas att närvaro av flora krävs för att tarminflammationen ska uppstå. Ett annat fynd som talar för florans viktiga roll är den uppreglering av TLR-2 och TLR-4 som påvisats hos hund med IBD. Uppregleringen av receptorerna pekar på en indirekt betydelse hos bakterierna (Xenoulis *et al.*, 2008) eftersom det är bakteriestrukturer som aktiverar receptorerna då de binder in som ligander. På Boxer har Simpson *et al.* (2006) kunnat identifiera och knyta invasiva och adherenta *E.coli* till IBD-typen histocytisk ulcerativ kolit, vilken rasen är predisponerad för och studien är ytterligare



bevis för sambandet mellan tarmens bakterier och IBDs patogenes. *E.coli* har dock inte enbart satts i samband med HUC, vilket Suchodolski *et al.* (2009) visade då de identifierade bakterien i kolons slemhinna även hos hundar med andra typer av IBD än HUC.

De studier som gjorts på IBD-hundars tarmflora har inte kunnat knyta någon specifik patogen till sjukdomen vilket talar för att det snarare är en generell störning av tarmfloran som hör ihop med inflammationen. Hypoteser finns om att en ändrad tarmflora kan orsaka en förändrad tarmbarriärfunktion, skada enterocyterna, inklusive dess "brush border" och öka konkurrensen om näring och vitaminer (Honneffer, 2014). En minskning av kommensala bakteriegrupper i tarmen kan dessutom leda till en minskad förmåga hos tarmens bakterier att nedreglera felaktiga inflammatoriska reaktioner (Suchodolski *et al.*, 2012a). På människa har det exempelvis visats att *Faecalibacterium prausnitzii* förekommer i minskad mängd hos IBD patienter. Bakterien utsöndrar metaboliter som verkar nedreglerande på 1L-12 och interferon- $\gamma$  uttrycken och ökar uttrycket av cytokinen 1L-10 vilket ger den antiinflammatoriska egenskaper. Det är därför troligt att minskad mängd *Faecalibacterium prausnitzii* kan minska de immuninhiberande mekanismer i tarmen och därmed leda till ökad inflammation (Honneffer, 2014).

## DISKUSSION

Vilka faktorer som leder till IBD och hur sjukdomen uppstår hos hund är fortfarande inte helt klarlagt men flera teorier finns. En av de mest utbredda uppfattningarna är att toleransen i tarmen på något vis bryts så att en immunologisk reaktion mot ofarliga antigen kan ske. Flera saker kan påverka den immunologiska toleransen och de artiklar jag tagit del av pekar på att såväl defekt tarmbarriär, felreglerat immunsystem och ändrad tarmflora spelar roll.

En ökad genomsläpplighet i tarmen gör att mer tarminnehåll, av både skadlig och harmlös natur, kan passera epitelbarriären och komma i kontakt med slemhinnans djupare delar. Under tarmytan finns immunförsvarsceller och receptorer i större utsträckning än uppe vid tarmlumen och en ökad tarmpermeabilitet kan därmed medföra en ökad stimulans av immunförsvaret som genererar i inflammation. Defekt tarmbarriär skulle i sig kunna vara det som skapar sjukdomen men det kan också vara en effekt av det immunologiska svaret. Oavsett om den ökade genomsläppligheten kommer primärt eller sekundärt anser jag att det är något som är viktigt för att IBD ska bli kroniskt. Den onormala passagen av antigen triggar en reaktion som kan skada barriären så att passagen ökar ytterligare. Det uppstår en kontinuerlig interaktion mellan antigen och immunförsvaret som underhåller inflammationen. Om tarmfloran och/eller PRR samtidigt är förändrade finns möjlighet till en kraftigare immunreaktion än i normalläget och sjukdomen blir nästintill omöjligt att bli av med.

PRRs är receptorer som vid exponering av antigen kan dra igång immunförsvaret och dess betydelse för IBDs patogenes har observerats i flera studier. Det är visat att hundar med IBD har ett ökat uttryck av TLR-mRNA i tarmen och trots att analyserna gjorts på mRNA och alltså inte färdigt protein har en uppreglering av receptorer antagits. Burgener *et al.* (2008) som gjorde studien menar att en uppreglering apikalt på tarmepitelet kan öka immunförsvarets

igenkänning av antigen och därigenom ge ökad inflammation. En brist i litteraturen som beskriver PRR-uttrycket är att det inte specificerats i vilka celler uppregleringen skett. Författarna skriver själva att det inte är klart om ökningen av TLR sker i epitelcellerna eller i immunceller som rekryteras till tarmslemhinnan.

En annan koppling mellan IBD och PRR har gjorts vid analyser av olika SNPs. Det har visats att SNPs i TLR-5 och TLR-4 generna ger förändrad struktur på receptorerna vilket kan påverka deras funktion och därmed även tarmens känslighet för olika antigen. Observationer tyder på att det finns haplotyper av TLR-5 som är skyddande mot IBD men vad gäller eventuella risk-associerade TLR-varianter är forskningen inte helt överens. Divergerade resultat har identifierats vilket gjort att TLRs betydelse ifrågasatts. Eftersom gener på hund ofta nedärvs tillsammans finns argument för att risk-haplotyperna inte är direkt kopplade till sjukdom. Istället är det möjligt att TLR-generna är länkade med en annan gen som är den som egentligen ökar risken för IBD (Kathrani *et al.*, 2011).

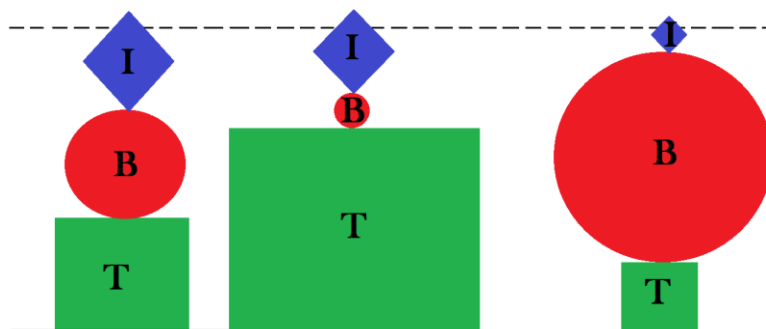
I mina öron låter teorin trolig även om jag inte helt håller med. Funktionella studier av TLR-5 har visat att den risk-associerade haplotypen är hyper-reaktiv mot sin ligand flagellin. Något jag ser som ett tecken på att TLR-5 är direkt kopplat till IBD. En möjlig förklaring till de olika forskningsresultaten är den påvisade funktionsskillnaden som identifierats hos TLR-5 i epitelceller jämfört med i immunceller. Om receptorn i immunceller, men inte i epitelceller, leder till produktion av inflammatoriska mediatorer så borde det innebära att det först krävs en defekt tarmbarriär för att ligand-receptor ska interagera och inflammation kunna uppstå. Om de hundar i studien där ingen koppling mellan risk-haplotyp och IBD sågs saknade/hade mindre defekt barriär är det inte konstigt att samband inte kunnat visas.

Den funktionella betydelsen av de två riskassocierade haplotyperna av TLR-4 är ännu inte visad. I Katharain *et als.* (2010) studie krävdes närvaro av den riskassocierade haplotypen av TLR-5 för att de båda SNP's i TLR-4 skulle vara betydande. Författarna har tolkat resultatet som att TLR-4 varianterna på egen hand saknar signifikant effekt. De föreslår att mutationer i TLR-4 istället får sin funktionella betydelse via TLR-5. Enligt Kathrani *et al.* kan en samtida förändring i TLR-4 och TLR-5 påverka TLR-5s intracellulära signalering mer än en muterad TLR-5 gör på egen hand och på så vis öka risken för sjukdom.

Studier som tittat på bakteriefloran hos hundar med IBD har kommit fram till varierande resultat men ökad förekomst av *Proteobacteria* verkar vara en genomgående observation. Skillnader mellan resultaten tror jag kan bero på att de olika studierna använt sig av olika provtagningsmetoder. I vissa fall har adherenta bakterier analyserats och i andra fall bakterier i tarmlumen. Det är därför troligt att analyser gjorda på tarmlumens bakterier även kan ha uppmätt bakterier som befunnits på "genomresa" i tarmen och som inte tillhör den normala floran. Dessutom har det inte angetts vilken IBD-typ hundarna lidit av och olika delar av tarmen har analyserats. En annan faktor som kan ha påverkat studierna är vilka hundgrupper som provtagits och hur många som undersökts. I några fall har IBD-hundarna även varit behandlade med antibiotika före studiestart och ibland hållits på olika dieter vilket kan ha påverkat floran och därmed resultaten.

Oavsett hur IBD uppkommer tror jag att tarminflammationen ändra miljön i tarmen så att andra bakterier än normalt trivs. Det gör att sekundära förändringar i tarmfloran lätt kan sammanblandas med förändringar som uppstått innan sjukdom vilket enligt mig gör det svårt att dra några riktiga slutsatser från de studieresultat som finns. Att tarmfloran har betydelse för IBD råder det dock ingen tvivel om. Alla studier jag läst har påvisat någon typ av förändring hos IBD-hundarna jämfört med kontroller och det är från djurmodeller känt att bakterier krävs för IBD-utveckling. Bakterier/bakteriedelar är många PRR receptorers ligander och det som kan trigga inflammation samtidigt som bakteriefloran visats ha en funktion för utveckling och reglering av tarmens immunförsvar.

### Inflammatoriskt tröskelvärde



*Figur 2. Defekter av olika faktorer i tarmen leder tillsammans till att det inflammatoriska tröskelvärdet överskrids. Respektive defekt/förändring är olika betydande i olika fall. T = tarmbarriär, B = bakterieflora, I = immunförsvar.*

Olika studier belyser olika faktorer som mer eller mindre viktiga för IBDs patogens och etiologi vilket jag tolkar som ett bevis på dess multifaktoriella natur. Då tarmens tolerans, oberoende av vad, påverkas tillräckligt mycket tror jag ett slags tröskelvärde för inflammation passeras. Inflammationen i sig kan sedan leda till sekundära förändringar som späder på sjukdomen och gör den kronisk. Jag tror därför inte att det finns en patogenes för IBD utan flera där olika mekanismer är mer eller mindre viktiga. I vissa IBD-fall är säkert ett uppreglerat TLR-uttryck det mest betydande medan det i andra fall är av större betydelse att tarmfloran ändrats (figur 2). Eftersom IBD dessutom kan drabba olika delar av tarmen är det troligt att olika faktorer är viktigare för sjukdom i olika tarmavsnitt. Exempelvis har kolon generellt en rikligare tarmflora jämfört med tunntarmen vilket gör att en uppreglering av PRR där borde kunna leda till en kraftigare stimulans av immunförsvaret och därmed ökad risk för inflammation.

För att få mer klarhet i hur IBD uppstår krävs mer forskning där större djurgrupper inkluderas och där PRR receptorernas och bakteriefloras betydelse undersöks mer ingående. En ökad förståelse för sjukdomen skulle underlätta både diagnostik och behandling av sjukdomen även om det troligen är svårt att hitta en behandling som passar alla. Idag är IBD lite av en "slaskdiagnos" och möjligen ligger det flera olika typer av tarmsjukdomar dolda i det stora

IBD-myllret. En kategorisering och möjlighet att skilja tarmsjukdomarna från varandra tror jag kan ge möjlighet till en mer specifikt utformad behandlingsmetod för olika individer och därmed mindre lidande, inte bara för hundarna utan också för oroliga djurägare.

## REFERENSLISTA

- Abreu, M. T., Fukata, M. & Arditi, M. (2005). TLR Signaling in the Gut in Health and Disease. *The Journal of Immunology*, 174(8): 4453–4460.
- Allenspach, K. & Werling, D. (2008). Innate Immune Response and IBD. *Veterinary Times*, 12: 38–40.
- Burgener, I. A., König, A., Allenspach, K., Sauter, S. N., Boisclair, J., Doherr, M. G. & Jungi, T. W. (2008). Upregulation of Toll-like receptors in chronic enteropathies in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(3): 553–560.
- Cario, E. (2012). Commensal-Innate Immune Miscommunication in IBD Pathogenesis. *Digestive Diseases*, 30(4): pp 334–340.
- Catchpole, B. & Allenspach, K. (2012). Canine inflammatory bowel disease: Does innate immunity fail to discriminate between friend and foe? *The Veterinary Journal*, 194(1): 7–8.
- Cerquetella, M. (2010). Inflammatory bowel disease in the dog: Differences and similarities with humans. *World Journal of Gastroenterology*, 16(9): 1050–1056.
- German, A. j., Hall, E. j. & Day, M. j. (2003). Chronic Intestinal Inflammation and Intestinal Disease in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(1): 8–20.
- Hisamatsu, T., Kanai, T., Mikami, Y., Yoneno, K., Matsuoka, K. & Hibi, T. (2013). Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 137(3): 283–297.
- Honneffer, J. B. (2014). Microbiota alterations in acute and chronic gastrointestinal inflammation of cats and dogs. *World Journal of Gastroenterology*, 20(44): 16489–16497.
- Kathrani, A., Holder, A., Catchpole, B., Alvarez, L., Simpson, K., Werling, D. & Allenspach, K. (2012). TLR5 Risk-Associated Haplotype for Canine Inflammatory Bowel Disease Confers Hyper-Responsiveness to Flagellin. *PLoS ONE*, 7(1): e30117.
- Kathrani, A., House, A., Catchpole, B., Murphy, A., German, A., Werling, D. & Allenspach, K. (2010). Polymorphisms in the Tlr4 and Tlr5 Gene Are Significantly Associated with Inflammatory Bowel Disease in German Shepherd Dogs. *PLoS ONE*, 5(12): e15740.
- Kobayashi, S., Ohno, K., Uetsuka, K., Nakashima, K., Setoguchi, A., Fujino, Y. & Tsujimoto, H. (2007). Measurement of Intestinal Mucosal Permeability in Dogs with Lymphocytic-Plasmacytic Enteritis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(7): 745–749.
- Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Petito, V. & Gasbarrini, A. (2013). Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut pathogens*, 5:23.
- Magalhaes, J. G., Tattoli, I. & Girardin, S. E. (2007). The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Seminars in Immunology*, 19(2): 106–115.

- Okanishi, H., Hayashi, K., Sakamoto, Y., Sano, T., Maruyama, H., Kagawa, Y. & Watari, T. (2013). NOD2 mRNA Expression and NFkappaB Activation in Dogs with Lymphocytic Plasmacytic Colitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(3): 439–444.
- Simpson, K. W., Dogan, B., Rishniw, M., Goldstein, R. E., Klaessig, S., McDonough, P. L., German, A. J., Yates, R. M., Russell, D. G., Johnson, S. E., Berg, D. E., Harel, J., Bruant, G., McDonough, S. P. & Schukken, Y. H. (2006). Adherent and Invasive *Escherichia coli* Is Associated with Granulomatous Colitis in Boxer Dogs. *Infection and Immunity*, 74(8): 4778–4792.
- Suchodolski, J. S., Dowd, S. E., Wilke, V., Steiner, J. M. & Jergens, A. E. (2012a). 16S rRNA Gene Pyrosequencing Reveals Bacterial Dysbiosis in the Duodenum of Dogs with Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE*, 7(6): e39333.
- Suchodolski, J. S., Markel, M. E., Garcia-Mazcorro, J. F., Unterer, S., Heilmann, R. M., Dowd, S. E., Kachroo, P., Ivanov, I., Minamoto, Y., Dillman, E. M., Steiner, J. M., Cook, A. K. & Toresson, L. (2012b). The Fecal Microbiome in Dogs with Acute Diarrhea and Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE*, 7(12): e51907.
- Suchodolski, J. S., Xenoulis, P. G., Paddock, C. G., Steiner, J. M. & Jergens, A. E. (2010). Molecular analysis of the bacterial microbiota in duodenal biopsies from dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Veterinary Microbiology*, 142(3-4): 394–400.
- Wdowiak, M., Rychlik, A. & Kołodziejska-Sawerska, A. (2013). Biomarkers in canine inflammatory bowel disease diagnostics. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16(3): 601–609.
- Xenoulis, P. G., Palculict, B., Allenspach, K., Steiner, J. M., House, A. M. V. & Suchodolski, J. S. (2008). Molecular-phylogenetic characterization of microbial communities imbalances in the small intestine of dogs with inflammatory bowel disease. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(3): 579–589.